



Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività
Ufficio Italiano Brevetti e Marchi
Ufficio G2

REC'D 11 JUN 2004

WIPO

PCT

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per: INV. IND.

N. RM2003A00149 DEL 02/04/03



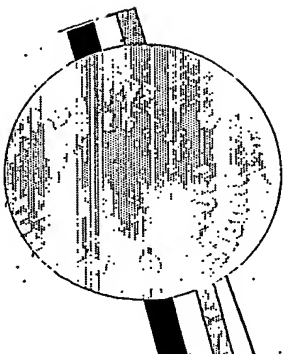
*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.*

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Roma, li 20 APR. 2004

IL DIRIGENTE
Dr. A. CAPONE
IL FUNZIONARIO

Augusto Capone



DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

A. RICHIEDENTE(I)
 1) Denominazione GIULIANI S.p.A. N.G. SIP
 Residenza Milano, MI codice 00752450155
 2) Denominazione _____
 Residenza _____ codice _____

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.
 Cognome e nome GITTO Serena ed altri Cod. fiscale _____
 Denominazione studio di appartenenza Ing. Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.
 Via Piemonte n. 26 città ROMA Cap 00187 (prov) RM

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario Ing. Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.
 Via Piemonte n. 26 città ROMA Cap 00187 (prov) RM

D. TITOLO classe proposta (sez./cl/sci) _____ gruppo/sottogruppo _____
"Oligonucleotidi (ODN) antisenso per Smad7 e loro usi in campo medico".

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI ☐ NO ☒ SE ISTANZA: DATA _____ / _____ / _____ N° PROTOCOLLO _____

E. INVENTORI DESIGNATI cognome e nome cognome e nome
 1) MONTELEONE Giovanni 3) _____
 2) _____ 4) _____

F. PRIORITÀ
 nazione o tipo di numero di domanda data di deposito Allegato
 organizzazione priorità _____ S/R _____
 1) _____
 2) _____

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione _____

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

NESSUNA

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.
 Doc. 1) 1 n. pag. 43 riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)
 Doc. 2) 1 n. tav. 02 disegno
 Doc. 3) 1 Lettera d'incarico
 Doc. 4) 1 designazione inventore
 Doc. 5) _____ documenti di priorità con traduzione in italiano
 Doc. 6) _____ autorizzazione o atto di cessione
 Doc. 7) _____ nominativo completo del richiedente

8) attestati di versamento, totale Euro DUECENTONOVANTUNO /80

COMPILATO IL 02/04/2003

CONTINUA SI/NO NO

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO SI

FIRMA DEL(I)
 RICHIEDENTE(I) GIULIANI S.p.A.

Ing. Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

UN MANDATARIO
 per se e per gli altri

Serena Gitto

(N° d'iscr. 962 B)

Serena Gitto

CAMERA di COMMERCIO, IND. ART. e AGR. - **RM 2003 A 000149** ROMA codice 58
 VERBALE DI DEPOSITO NUMERO DI DOMANDA _____ Reg. A

L'anno DUEMILATRE, il giorno DUE, del mese di APRILE

Il(I) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n 00 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraportato.

ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE _____

L. DEPOSITANTE



L'UFFICIALE ROGANTE

L'Ufficiale Rogante
Stefano Altieri

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE

PROSPETTO A

NUMERO DOMANDA

REG. A

DATA DI DEPOSITO 02/04/2003

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

1. RICHIEDENTE

RM 2003 A 000149

1) Denominazione

GIULIANI S.p.A.

2) Denominazione

2. TITOLO

"Oligonucleotidi (ODN) antisense per Smad7 e loro usi in campo medico"

Classe proposta (sez./cl./scl/)

(gruppo/sottogruppo)

RIASSUNTO

L'invenzione concerne sequenze oligonucleotidiche (ODN) antisense per Smad7 opportunamente modificate e loro usi in campo medico come agenti biologici terapeutici in particolare, nel trattamento delle malattie infiammatorie croniche intestinali, quali la malattia di Crohn e la rettocolite ulcerosa.

M. DISEGNO



DESCRIZIONE

a corredo di una domanda di brevetto per invenzione industriale dal titolo: "Oligonucleotidi (ODN) antisenso per Smad7 e loro usi in campo medico"

Titolare: Giuliani S.p.A.

Inventori: Giovanni MONTELEONE

La presente invenzione concerne oligonucleotidi (ODN) antisenso per Smad7 e loro usi in campo medico.

Più in particolare l'invenzione si riferisce a sequenze ODN antisenso per Smad7 opportunamente modificate, che mostrano una sorprendente attività biologica di inibizione specifica dell'espressione di Smad7 e sono pertanto utilizzabili in campo medico come agenti biologici terapeutici, ed in particolare nel trattamento delle malattie infiammatorie croniche intestinali (MICI).

La malattia di Crohn (MC) e la rettocolite ulcerosa (RCU) sono le principali patologie infiammatorie croniche intestinali umane. Entrambe le malattie sono entità cliniche complesse, la cui patogenesi è strettamente dipendente dall'interazione di diversi fattori genetici, ambientali ed immunologici.

Nonostante la MC e la RCU esibiscano marcate differenze sia sul piano patofisiologico sia su quello clinico, l'approccio terapeutico ai pazienti sofferenti di queste patologie presenta molti elementi in comune. La variabilità della presentazione clinica, del tipo e delle estensioni delle lesioni, e del tipo di complicanze condiziona la scelta

terapeutica, sebbene l'intervento farmacologico rappresenti l'approccio iniziale prevalente.

La salicilazosulfapiridina e l'acido 5-amminosalicilico sono farmaci di provata efficacia nella gestione delle forme lievi di MICI e nella terapia di mantenimento della remissione.

Nelle fasi con attività moderata-severa e nei casi con impegno dello stato generale è necessario il ricorso ai corticosteroidi. Dalle analisi a medio e lungo termine delle principali casistiche mondiali risulta che la remissione clinica è ottenibile in solo i due terzi dei pazienti ricevanti corticosteroidi, e che solo per il 50% di questi pazienti non si verifica alcuna riaccensione dopo la sospensione del farmaco.

La somministrazione continua di corticosteroidi, oltre al fenomeno di dipendenza da questi farmaci che si instaura, è gravata da un altissimo rischio di effetti indesiderati.

Anche il trattamento con immunosoppressori, che spesso accompagna o sostituisce la terapia corticosteroidea, non sempre assicura il contenimento della flogosi ed il controllo dei sintomi, e peraltro ha lo svantaggio di avere numerose controindicazioni e causare gravi effetti collaterali (Podolsky, 2002).

I farmaci di nuova generazione, resi disponibili a partire dagli anni '90, sono gli agenti biologici. La più approfondita conoscenza della storia naturale delle MICI e di alcuni dei principali meccanismi patofisiologici ha contribuito ad orientare più concretamente l'intervento medico. Si è così assistito allo sviluppo di bioterapie mirate a controllare specifici "pathways" infiammatori, mediante l'impiego di

proteine umane ricombinanti, anticorpi monoclonali chimerici ed umanizzati e proteine di fusione. In tale contesto, gli agenti che hanno mostrato una migliore efficacia nella MC sono gli anticorpi monoclonali chimerici diretti a bloccare il TNF- α , una citochina proinfiammatoria prodotta in eccesso nel corso di MICI (Seegers et al., 2002). Questo composto, che è attualmente in fase IV di sperimentazione clinica, è efficace nel contenere l'infiammazione in circa il 60-70% dei pazienti trattati. Tuttavia, sono stati evidenziati alcuni effetti collaterali con una frequenza di incidenza non trascurabile, ravvisabili in slatentizzazioni di infezioni microbiche, fenomeni di ipersensibilità, e nella formazione di autoanticorpi. Quest'ultimo fenomeno potrebbe risiedere nel fatto che l'anti-TNF- α neutralizza una citochina, il TNF- α , avente molteplici funzioni biologiche.

Unitamente all'effetto infiammatorio, il TNF- α partecipa infatti ai meccanismi coinvolti all'induzione e mantenimento della tolleranza immunitaria. Pertanto un blocco dell'attività del TNF- α potrebbe, paradossalmente, favorire reazioni immunologiche eccessive (Sandborn et al., 2002).

L'insieme di queste considerazioni suggerisce la necessità di nuovi studi su modelli animali di MICI, attraverso i quali identificare nuovi principi attivi per un migliore e duraturo trattamento di tali patologie (Fiocchi, 2001).

Il trattamento con anti-TNF- α , come altre bioterapie quali la somministrazione di citochine anti-infiammatorie, ad esempio dell'IL-10, rappresenta un approccio terapeutico di tipo extracellulare, mirato a

contenere gli effetti biologici di molecole secrete da cellule infiammatorie.

Lo studio delle vie di trasmissione del segnale innescato dall'interazione delle citochine con i propri recettori ha delineato la possibilità di utilizzare nuove strategie terapeutiche capaci di modificare selettivamente e specificamente l'espressione intracellulare di importanti molecole infiammatorie e non.

In condizioni normali, la mucosa intestinale è sede di un infiltrato infiammatorio, cosiddetto "fisiologico", mantenuto da un delicato equilibrio tra molecole pro-infiammatorie ed anti-infiammatorie.

A questo proposito un ruolo determinante è esercitato dal TGF- β 1, una citochina multifunzionale in grado di regolare la crescita, il differenziamento e l'attività di molteplici cellule del sistema immunitario e non.

Studi *in vitro* ed *in vivo* hanno dimostrato che il TGF- β 1 è un potente immunoregolatore capace di contenere l'infiammazione mucosale intestinale, e che l'inibizione della sua attività invariabilmente si accompagna allo sviluppo di coliti che mostrano somiglianze immuno-morfologiche con la MC o la RCU (Powrie F. et al., 1996; Neurath M. et al., 1996; Ludviksson B. R. et al., 1997).

Infatti, topi privi di geni per TGF- β 1 sviluppano gravi risposte infiammatorie multifocali, anche a livello intestinale, associate ad una eccessiva produzione di citochine infiammatorie da parte di numerosi tipi cellulari, tra i quali i linfociti T (Shull M. M. et al., 1992; Christ M. et al. 1994).

ING. DARZANO & ZAMARCO ROMA SPA



Similmente, l'inibizione della cascata del segnale mediata dal TGF- β 1 in topi, derivante dall'espressione di una forma mutante dominante negativa del recettore TGF- β 1 RII, si traduce in un aumento di suscettibilità all'insorgenza di coliti sperimentali (Hahm K.B. et al., 2001).

Infine, è stato dimostrato che l'inibizione specifica del meccanismo di trasmissione del segnale mediato dal TGF- β 1 in cellule T, mediante l'espressione di una forma dominante negativa del recettore di TGF- β 1 RII, si accompagna allo sviluppo di una malattia autoimmune caratterizzata da gravi infiltrazioni infiammatorie a livello polmonare e del colon e dalla presenza di auto-anticorpi circolanti (Gorelik L. et al., 2000). Questi dati indicano che la perdita di attività di una singola molecola anti-infiammatoria può essere sufficiente per alterare l'omeostasi intestinale e facilitare risposte immunitarie culminanti nel danno tissutale.

L'attività anti-infiammatoria del TGF- β 1 è innescata dall'interazione della molecola con un complesso recettoriale eterodimerico, serina/treonina chinasi di membrana, costituito da due subunità, denominate rispettivamente TGF- β 1 R1 e TGF- β 1 R2. In seguito al legame con il TGF- β 1, le molecole recettoriali ruotano all'interno del complesso sopra menzionato, e ciò risulta in un processo di transfosforilazione e conseguente attivazione del TGF- β 1 R1 da parte del TGF- β 1 R2 costitutivamente attivo ed in grado di autofosforilarsi.

La propagazione del segnale mediata dall'attivazione del TGF-

$\beta 1$ al nucleo si avvale della presenza di proteine appartenenti alla famiglia Smad. L'attivazione del TGF- $\beta 1$ R1 causa la fosforilazione diretta delle proteine Smad2 e Smad3, che diventano così capaci di interagire con Smad4, ed il complesso Smad2-3/Smad4 di migrare nel nucleo, dove partecipa al controllo trascrizionale di alcuni geni (Heldin C-H. et al., 1997).

Il ruolo di Smad3 nell'attività anti-infiammatoria del TGF- $\beta 1$ viene enfatizzato da studi condotti in modelli animali, in cui si è dimostrato che la delezione del gene codificante per Smad3 si accompagna ad una diminuita responsività delle cellule nei confronti del TGF- $\beta 1$, e consensuale sviluppo di una malattia infiammatoria, caratterizzata da una infiltrazione massiva di cellule T e formazione di ascessi piogenici a livello gastrointestinale (Yang X. et al., 1999).

Alla famiglia delle proteine Smad appartengono anche altre proteine intracellulari con attività antagonista come, ad esempio, Smad7. Tale proteina legandosi al TGF- $\beta 1$ R1 ostacola il legame di Smad2/Smad3 al recettore, impedendone di conseguenza la fosforilazione e l'attivazione. L'aumento di espressione della proteina Smad7 si associa quindi invariabilmente ad un'inibizione della cascata del segnale mediata dal TGF- $\beta 1$ (Hayashi H. et al., 1997).

La valutazione della espressione del TGF- $\beta 1$ nella mucosa intestinale di pazienti con MICI ha rivelato che la produzione di tale molecola è paradossalmente aumentata rispetto a quanto documentabile nell'intestino di soggetti sani (Lawrance IC. et al., 2001).

In un recente lavoro l'autore della presente invenzione ha

dimostrato che campioni di mucosa di pazienti affetti da MICI sono caratterizzati da elevati livelli di Smad7 e da ridotti livelli di Smad3 attiva, indicando che nel corso di tali patologie, il meccanismo di trasmissione del segnale mediato dal TGF- β 1 è compromesso. L'autore della presente invenzione ha altresì dimostrato che il blocco selettivo di Smad7 mediante l'impiego di uno specifico oligonucleotide antisense fosforotioato (5'-GTCGCCCCCTTCTCCCCGCAGC-3') reintegra la responsività al TGF- β 1 delle cellule mononucleate della lamina propria intestinale (LPMC), un evento che si traduce nella diminuita produzione di citochine proinfiammatorie quali ad esempio, TNF- α .

Inoltre, anche in esperimenti *ex vivo* condotti su frammenti di mucosa intestinale di pazienti affetti da MICI, è stato verificato che la somministrazione di ODN antisense per Smad7 ripristina il meccanismo di trasmissione del segnale mediato dal TGF- β 1 e comporta una diminuita sintesi di citochine (Monteleone et al., 2001).

In corso di MICI, la mucosa intestinale è infiltrata da un elevato numero di cellule linfocitarie T. Queste cellule sono considerate come i principali mediatori del danno tissutale operante in queste patologie.

L'aumento del numero di linfociti T nella mucosa intestinale di pazienti con MICI è in parte dipendente dalla resistenza di tali cellule a stimoli capaci di indurre la loro morte (apoptosi).

Si ritiene che il blocco dell'apoptosi delle cellule T giochi un ruolo chiave nel mantenimento dello stato infiammatorio a livello della mucosa affetta da MICI (Boirivant et al., 1999). Infatti, l'aumento della morte cellulare accompagna la risoluzione dell'infiammazione

intestinale. Il meccanismo esatto che innesca, in condizioni di MICI, la resistenza delle cellule T agli stimoli apoptotici non è ancora noto, anche se sembra in parte dipendere dall'azione di citochine rilasciate localmente.

Dati ottenuti in esperimenti *in vitro* su colture cellulari e da studi *in vivo* indicano che il TGF- β 1 può sia prevenire che scatenare la morte di linfociti T e che la capacità del fattore di mediare l'una o l'altra risposta sia sito-specifica (Han SH. et al., 1998; Arsura M. et al., 1996).

Topi privi del gene per Smad3 mostrano un massiccio aumento nel numero di cellule infiammatorie a livello intestinale, suggerendo un possibile ruolo del TGF- β 1 nel controllo della apoptosi dei linfociti T a livello intestinale (Yang et al., 1999).

Pertanto l'inibizione di Smad7 mediante l'impiego di ODN antisense sintetici potrebbe essere considerato un nuovo e plausibile approccio bioterapeutico "endogeno" per le malattie infiammatorie croniche, in particolare delle MICI, poiché, come sopra menzionato, causa il ripristino della responsività delle cellule T al TGF- β 1.

Gli oligonucleotidi (ODN) antisense sono brevi sequenze oligonucleotidiche sintetiche complementari all'RNA messaggero (m-RNA) codificante per la proteina bersaglio dell'inibizione mirata e specifica. Tali sequenze, appaiandosi con l'm-RNA, formano un tratto di doppia catena ibrida, e questo porta all'attivazione di enzimi catalitici ubiquitari, come le RNasi H, che degradano le catene ibride DNA/RNA che si formano in natura per innescare la duplicazione del DNA, impedendo così la traduzione proteica.



La scelta delle regioni e delle sequenze dell'm-RNA più idonee a complementarsi con l'ODN presenta caratteri del tutto empirici anche se in genere ODN complementari alla regione di inizio trascrizione 5' ed alle regioni di splicing risultano più efficaci. Il disegno di un numero cospicuo di ODN antisenso, una volta individuati i possibili siti bersaglio, non presenta particolari difficoltà, grazie anche alle moderne ed avanzate tecnologie di sintesi automatizzata di cui sono in possesso alcune ditte specializzate in tale campo.

Al contrario l'identificazione dell'ODN più attivo, per eventuali applicazioni terapeutiche, richiede un lungo lavoro di screening mediante saggi di efficacia in test quantitativi. A questo proposito sono note sequenze ODN antisenso specifiche per determinati bersagli, tra i quali anche Smad7 (Brevetto statunitense No. US 6,159,697; a nome ISIS Pharmaceuticals Inc.).

L'utilizzo di ODN antisenso per la regolazione genica sia *in vitro* che *in vivo* presenta una serie di ostacoli quali, ad esempio, la difficoltà di attraversamento delle membrane cellulari, dovuta alla natura polianionica e quindi idrofila delle molecole, e la rapida degradazione enzimatica.

Per ovviare a tali inconvenienti si ricorre a modifiche chimiche degli ODN antisenso quali, ad esempio, fosforotioazione, come nel caso della sequenza sopra citata specifica per Smad7 (Monteleone et al., 2001), o fosforoammidazione, cioè sostituzioni degli atomi di ossigeno non a ponte del legame fosfodiesterico con atomi di zolfo o di azoto.

Come molti prodotti di origine biotecnologica, la dimostrazione di una attività biologica prospetta delle potenzialità terapeutiche.

Infatti gli ODN possono essere utilizzati sia nello studio delle funzioni di geni e proteine coinvolte nella patogenesi di diverse malattie sia a scopo terapeutico. Mentre nel primo campo di applicazione la metodologia antisense ha avuto successo per la semplicità dei principi guida, ben più complesso si è dimostrato il passaggio dalla sperimentazione *in vitro* a quella *in vivo* soprattutto per quanto concerne aspetti farmacocinetici, farmacodinamici e tossicologici di questi nuovi farmaci (Maggi A., 1998).

Ad esempio l'ODN antisense per Smad7 impiegato nel corso degli esperimenti precedentemente condotti dall'autore della presente invenzione (5'-GTCGCCCCCTTCTCCCCGCAGC-3'), che mostra attività biologica *in vitro*, potrebbe essere gravato da un aumentato rischio di effetti indesiderati qualora venisse utilizzato *in vivo*. Infatti, tale ODN contiene due coppie nucleotidiche CG che a seguito della fosforotioazione, un processo essenziale per aumentare la stabilità dell'ODN, diverrebbero CpG. Queste ultime sono sequenze dotate di una potente attività stimolatoria del sistema immunitario per cui l'impiego dell'ODN sopra indicato, come tale, potrebbe peggiorare il decorso di qualsiasi malattia mediata immunologicamente, inclusa la malattia di Crohn e la colite ulcerosa.

Un tale approccio terapeutico non sarebbe ipotizzabile soprattutto nella malattia di Crohn, una patologia mediata da una particolare classe di linfociti T, detti Th1, sotto lo stimolo

dell'interleuchina 12. Infatti le molecole CpG, in quanto potenti induttori della sintesi di IL-12, potrebbero ulteriormente promuovere lo sviluppo di linfociti Th1.

In aggiunta, la somministrazione *in vivo* di ODN antisense contenenti dinucleotidi CpG si accompagna ad un aumentato rischio di effetti collaterali, rispetto ad oligonucleotidi privi di CpG. In particolare è stato documentato un aumentato rischio di iperplasia del sistema reticoloendoteliale della milza, rene e fegato, nonché aumento della proliferazione delle cellule ematopoietiche (Agrawal S. et al., 2002).

Un altro limite nell'impiego di ODN è legato agli effetti indesiderati che derivano dall'azione dei metaboliti prodotti della degradazione della molecola, che risulta essere piuttosto suscettibile all'attacco delle nucleasi, non essendo protetta alle estremità 5' e 3'.

Di qui la necessità di apportare modifiche chimiche allo scheletro dell'ODN antisense fosforotioato a carico delle coppie CpG e delle estremità 5' e 3'. Tuttavia le sopracitate modifiche alla sequenza ODN potrebbero causare una diminuzione o scomparsa dell'attività biologica di inibizione della sintesi di Smad7 e, in alcuni casi, addirittura un'inversione dell'attività desiderata sia *in vitro* che *in vivo*.

E' altresì importante poter disporre di modelli sperimentali di MICI adeguati per effettuare gli studi *in vivo*, che consentano di aumentare le conoscenze riguardo ai meccanismi che comportano la perdita della regolazione della risposta immunitaria ed il loro ruolo nell'insorgenza della patologia MICI e sulle possibilità di modulare o prevenire tale risposta, limitando il progredire dell'infiammazione a

livello della mucosa. A questo proposito la colite indotta da TNBS rappresenta un valido e diffuso modello di infiammazione della mucosa che mostra somiglianze immunomorfologiche con la malattia di Crohn umana (Neurath M. et al., 2000).

Alla luce di quanto sopra esposto, risulta evidente l'esigenza di potere disporre di nuovi agenti biologici terapeutici, quali gli ODN antisenso per Smad7, attivi sia *in vitro* sia *in vivo*, per il trattamento delle MICI mediante un approccio bioterapeutico di tipo "endogeno".

L'autore della presente invenzione ha ora trovato sequenze ODN antisenso per Smad7 opportunamente modificate che mostrano un'attività biologica di inibizione dell'espressione di Smad7 più alta *in vivo* in modelli sperimentali murini di MICI, rispetto all'attività di inibizione *in vitro* delle stesse, e anche più alta di altre sequenze note alle quali sono state apportate le medesime modifiche e che sono state testate sugli stessi modelli.

In particolare, le sequenze ODN che hanno mostrato una più alta attività biologica *in vivo* sono state progettate sulla base della sequenza dell'ODN antisenso fosforotioato (5'-GTCGCCCCCTTCTCCCCGCAG-3') che ha come target il sito 403 dell'm-RNA umano codificante per Smad7, utilizzata dall'autore della presente invenzione nel corso di precedenti esperimenti.

In vista del potenziale e futuro impiego di tali ODN antisenso fosforotioato per Smad7 nel trattamento di patologie umane la suddetta sequenza è stata modificata a livello dei dinucleotidi CpG in essa contenuti, di seguito indicati con XY, per le ragioni già citate



concernenti la loro immunogenicità.

Lo studio condotto dall'autore ha quindi consentito di testare l'efficacia *in vivo* ed *in vitro* di diversi ODN antisenso noti e nuovi per Smad7 e la loro eventuale tossicità, e di indagare se l'inibizione dell'espressione di Smad7 si traduca di fatto in una risoluzione dell'infiammazione della mucosa in modelli sperimentali di MICI.

Le sequenze ODN antisenso sopra menzionate opportunamente modificate secondo la presente invenzione, oltre ad una maggiore attività biologica *in vivo*, hanno sorprendentemente mostrato l'assenza di effetti collaterali negli animali, contrariamente a quanto avvenuto in seguito alla somministrazione di altre sequenze nel corso del medesimo progetto. Inoltre, sequenze ODN secondo l'invenzione sono risultate efficaci nel limitare l'infiltrazione linfocitaria e quindi l'ulteriore propagarsi dell'infiammazione, evidenza non riscontrata per le altre sequenze ODN antisenso testate.

Da questi studi in modelli sperimentali il ruolo di Smad7 come bersaglio biologico emerge con chiarezza, così come i possibili effetti terapeutici di una sua inibizione.

Inoltre, nell'ambito della presente invenzione è stato trovato un ulteriore ruolo di Smad7 nell'induzione dell'apoptosi delle cellule T in corso di MICI. Impiegando alcuni ODN antisenso per Smad7 si è infatti dimostrato che il TGF- β 1 regola la morte cellulare dei linfociti T a livello intestinale e che un'attività difettosa del fattore può essere determinante per l'instaurarsi di fenomeni di resistenza cellulare agli stimoli apoptotici, che sono responsabili del mantenimento dello stato

infiammatorio a livello della mucosa.

Formano pertanto oggetto specifico della presente invenzione oligonucleotidi antisenso fosforotioati per Smad 7 di lunghezza fino a 21 nucleotidi comprendenti una porzione di almeno 10 nucleotidi della seguente sequenza:

5'-GTXYCCCCTTCTCCCXYCAG-3'

in cui X è un nucleotide comprendente una base azotata scelta dal gruppo che consiste in citosina, 5-metilcitosina e 2'-O-metilcitosina ed in cui Y è un nucleotide comprendente una base azotata scelta dal gruppo che consiste in guanina, 5-metilguanina e 2'-O-metilguanina, a condizione che almeno uno dei nucleotidi X o Y comprenda una base azotata metilata;

o la sequenza ad essa complementare.

Sono considerate anche le sequenze oligonucleotidiche dei diversi stereoisomeri degli oligonucleotidi antisenso oggetto della presente invenzione, quali diastereoisomeri ed enantiomeri, rispetto agli atomi di fosforo dei legami internucleosidici presenti nella sequenza. Infatti il legame internucleosidico può essere fosforotioato oppure metilfosfonato ed in entrambi i casi il fosforo, legato a quattro gruppi chimici diversi rappresenta un centro chirale.

Gli oligonucleotidi antisenso secondo la presente invenzione possono avere almeno un nucleotide della sequenza metilfosfonato, ad esempio, ad una sola estremità 5' o 3' o ad entrambe le estremità 5' e 3' o lungo la sequenza oligonucleotidica.

In una forma preferita di realizzazione il nucleotide

metilfosfonato può essere X o Y, in modo tale che il legame internucleosidico metilfosfonato sia il legame tra detti nucleotidi.

Ulteriori modifiche possono essere apportate alle estremità 5' e 3' e/o lungo la sequenza dell'ODN antisenso al fine di aumentare la stabilità della molecola prevenendone la degradazione ad opera di nucleasi e riducendo il rischio di effetti indesiderati derivati dall'azione di metaboliti.

Gli oligonucleotidi antisenso secondo la presente invenzione possono ulteriormente avere almeno un nucleotide della sequenza che è un 2'-O-metilribonucleotide 5'-monofosfato, ad esempio, ad una sola estremità 5' o 3' o ad entrambe le estremità 5' e 3' o lungo la sequenza oligonucleotidica.

Costituiscono ulteriore oggetto della presente invenzione oligonucleotidi antisenso sopra descritti in cui i 2'-desossiribonucleotidi sono sostituiti con ribonucleotidi e la 2'-desossitimidina è sostituita con uridina in modo tale che le sequenze desossiribonucleotidiche antisenso siano modificate nelle corrispondenti sequenze ribonucleotidiche antisenso.

Una forma preferita di realizzazione della presente invenzione è rappresentata da un oligonucleotide antisenso avente la sequenza:

5'-GTXGCCCCTTCTCCCXGCAG-3'

in cui X è 5-metil 2'-desossicitidina 5'-monofosfato.

Una ulteriore forma preferita di realizzazione è un oligonucleotide avente la sequenza:

5'-ZTXGCCCCTTCTCCCXGCAZ-3'

in cui X è 5 metil 2'-desossicitidina 5'-monofosfato e Z è 2'-desossiguanosina metilfosfonato.

Le sequenze ODN antisenso secondo la presente invenzione possono essere vantaggiosamente utilizzate in campo medico; pertanto costituiscono ulteriore oggetto della presente invenzione composizioni farmaceutiche comprendenti almeno uno degli oligonucleotidi antisenso sopra descritti come principio attivo ed uno o più coadiuvanti e/o eccipienti farmacologicamente accettabili, i quali sono noti agli esperti del settore.

L'invenzione si riferisce, inoltre, all'uso delle suddette sequenze oligonucleotidiche antisenso per la preparazione di un medicamento per il trattamento delle malattie associate con l'espressione di Smad7. In particolare, tali malattie associate con l'espressione di Smad7 sono le MICI, quali ad esempio, la MC e la RCU.

La presente invenzione verrà ora descritta a titolo illustrativo, ma non limitativo, secondo sue forme preferite di realizzazione, con particolare riferimento alle figure dei disegni allegati, in cui:

la figura 1 mostra l'effetto sul numero di linfociti T intestinali in campioni mucosali prelevati da pazienti con MC dopo 40 ore di trattamento con ODN antisenso e senso (SEQ. N°2) per Smad7;

la figura 2 mostra l'analisi dell'espressione del complesso p-Smad2/Smad3 e del complesso Smad2/Smad3 in totale in LPMC isolate dall'intestino di topi trattati con TNBS (TNBS), non trattati con TNBS (Unt), trattati con etanolo come controlli (EtOH);

la figura 3 mostra l'analisi dell'espressione di Smad7 in LPMC

ING. BARZANO & ZAMATO ROMA SpA



isolate dall'intestino di topi trattati con TNBS (TNBS), non trattati con TNBS (Unt), trattati con etanolo come controlli (EtOH).

ESEMPIO 1: *Studio sull'effetto degli oligonucleotidi antisenso per Smad7 secondo la presente invenzione sull'apoptosi delle cellule T intestinali.*

MATERIALI E METODI

Sintesi ODN antisenso

Tutti gli ODN antisenso sono stati sintetizzati dalla ditta MWG Biotech AG (MWG Biotech S.r.l., Firenze) impiegando metodiche standard automatizzate con un sintetizzatore automatico di DNA usando i protocolli della chimica classica delle fosforoamiditi (Lesiak K. et al., 1993; Xiao W. et al., 1996).

Gli oligonucleotidi contenenti 5-metil-2'-desossicitidina (5-Me-dC) sono stati sintetizzati impiegando metodi di sintesi noti (Sanghvi et al., 1993) utilizzando fosforoamiditi commercialmente disponibili, mentre gli oligonucleotidi modificati con gruppi metilfosfonati (MeP) sono stati sintetizzati impiegando protocolli già noti (Maier MA. et al., 2002).

La purificazione delle molecole oligonucleotidiche è stata effettuata utilizzando la tecnologia HPSF, sviluppata da MGW Biotech. Tale procedura di purificazione si è rivelata molto efficiente poiché consente di rimuovere le sequenze di scarto che vengono sintetizzate erroneamente durante il processo di sintesi chimica automatizzato, quali ad esempio sequenze n-1, n-2, n-x, che non vengono rimosse impiegando i classici metodi di purificazione standard.

La tecnologia sopra citata, oltre a consentire di ottenere il 100%

di sequenze della lunghezza desiderata senza prodotti di scarto indesiderati, permette altresì di evitare la successiva operazione di desalificazione, poiché le sequenze risultano purificate sia dai sali sia dagli ioni metallici.

A questo punto, data l'assenza di sali, si procede con l'analisi degli oligonucleotidi mediante le tecniche di spettrometria di massa MALDI-TOF secondo protocolli standard (Guerlavais T. et al., 2002; Ragas JA. et al., 2000). Quindi gli oligonucleotidi vengono sterilizzati e la soluzione risultante viene analizzata quantitativamente misurando la densità ottica (OD) mediante spettrofotometro UV/visibile. Infine le molecole vengono risospese in PBS1x sterile prima di essere utilizzate.

Tutti gli ODN antisenso utilizzati aventi come bersaglio l'm-RNA codificante per Smad7 mappano in siti che mostrano omologia del 100% tra uomo e topo. In tutti gli oligonucleotidi presentati nel seguito il legame internucleosidico è un legame fosforotioato.

Le sequenze ODN antisenso utilizzate nel corso di tale esperimento sono state progettate sulla base della SEQ. N°1 dell'ODN antisenso fosforotioato (5'-GTCGCCCCTTCTCCCCGCAGC-3') che ha come target il sito 403 dell'm-RNA umano codificante per Smad7, utilizzata dall'autore della presente invenzione nel corso di precedenti esperimenti (Monteleone et al, 2001).

La sequenza dell'ODN antisenso per Smad7 SEQ. N°2 (5':MePG TMe-dCGCCCCTTCTCCCMMe-dCGCAMEPG-3') ha come target il sito 403 dell'm-RNA umano codificante per Smad7. Si tratta di un oligonucleotide misto in cui si osservano modifiche apportate a carico

delle citosine appartenenti alle coppie CG della SEQ. N°1 che ivi figurano come metilcitosine (indicate con Me-dC). Inoltre la molecola reca alle estremità dei ponti metilfosfonati (indicati con MeP).

La sequenza dell'ODN antisenso per Smad7 SEQ N°3 (5': GTT TGG TCC TGA ACA TGC-3') mappa nel sito 294 dell'm-RNA umano codificante per Smad7.

I campioni della mucosa sono stati prelevati dopo resezione da 6 pazienti affetti da MC avente attività moderata-severa e da 4 pazienti con RCU con attività severa. In aggiunta, sono stati utilizzati campioni di mucosa intestinale sana prelevati da 10 pazienti non affetti da MICI che avevano subito interventi di colectomia per carcinoma del colon (l'approvazione etica è stata ottenuta da un comitato locale). Le LPMC sono state preparate usando la procedura DTT-EDTA-collagenasi e risospese in RPMI 1640 (Sigma-Aldrich S.r.l., Milano), aggiungendo in sostituzione del siero il reagente HL-1 (Biowhittaker, Wokingham, UK).

Le cellule sono state coltivate in presenza ed in assenza di TGF- β 1 (Sigma-Aldrich, concentrazione finale variabile da 1 a 5 ng/ml) e analizzate dopo 48 ore di incubazione per rilevare i livelli di apoptosi.

In altri esperimenti, le LPMC isolate dall'intestino di pazienti con MICI sono state risospese in RPMI 1640 aggiungendo in sostituzione del siero il reagente HL-1 e coltivate in presenza ed in assenza degli ODN antisenso sopra menzionati per Smad7 (SEQ. N°2 o SEQ. N°3), ed in presenza di un oligonucleotide senso come controllo (in entrambi i casi sono state utilizzate delle concentrazioni pari a 2 μ g/ml). Dopo 24 ore, un'aliquota di LPMC è stata usata per estrarre le proteine e

valutare l'espressione di Smad7. Le cellule rimanenti sono state lavate accuratamente e risospese in RPMI 1640 con aggiunta di HL-1 e coltivate in presenza o assenza di TGF- β 1 (5 ng/ml) per 48 ore e successivamente analizzate per valutare i livelli di apoptosi.

Analisi della apoptosi mediante citofluorimetria a flusso

L'apoptosi è stata analizzata utilizzando ioduro di propidio (PI) come colorante e successiva analisi citofluorimetrica.

Le cellule sono state lavate, incubate per 15 minuti a 37°C in 5 μ l di ribonucleasi A (0,6 μ g/ml, 30-60 unità Kunitz, Sigma-Aldrich), e quindi congelate. Lo ioduro di propidio (100 μ g/ml) è stato aggiunto prima dell'analisi citofluorimetrica.

I linfociti T sono stati identificati usando uno specifico anticorpo monoclonale anti-CD3 (DAKO Ltd., Cambridgeshire, UK).

Estrazione proteica ed analisi mediante Western Blotting

Le LPMC sono state omogeneizzate e le proteine totali estratte mediante un tampone A contenente 10 mM Hepes (pH 7,9), 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA e 0,2 mM EGTA. Il tampone è stato integrato con 1 mM ditiotreitolo (DTT), 10 μ g/ml di aprotinina, 10 μ g/ml di leupeptina e 1 mM di fenilmetansolfonil fluoruro (tutti i reagenti sono stati forniti da Sigma-Aldrich).

La proteina Smad7 è stata analizzata usando un anticorpo di coniglio specifico anti-Smad7 umano (1:400 diluizione finale, Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA). Anticorpi di capra anti-coniglio coniugati all'enzima perossidasi (Dako Ltd) sono stati usati ad una diluizione finale di 1:20.000 per la rivelazione del legame dell'anticorpo

ING. BALEANO & ZAMARRO ROMA SPA



primario e l'immunoreattività è stata monitorata mediante un kit di chemiluminescenza (Pierce, Rockford, IL, USA).

Culture d'organo

I frammenti di mucosa provenienti da campioni chirurgici prelevati da pazienti sono stati posti in coltura in presenza o in assenza di ODN antisenso per Smad7 (SEQ. N°2 o SEQ. N°3; entrambe usate a concentrazioni finale di 10 µg/ml) per 40 ore.

Come controllo negativo, è stato utilizzato un frammento di mucosa posto in coltura in presenza dell'ODN senso per Smad7.

Alla fine della coltura, i frammenti mucosali sono stati raccolti e usati per analizzare il numero di linfociti T della lamina propria mediante immunoistochimica.

A questo scopo sono state preparate sezioni di mucosa e marcate con un anticorpo anti-CD3 (DAKO). Anticorpi di capra anti-topo coniugati con fosfatasi alcalina (DAKO) sono stati usati per la rivelazione del legame dell'anticorpo primario.

RISULTATI

I risultati ottenuti nei diversi esperimenti dimostrano come il TGF-β1 regoli in modo positivo, dipendente dalla dose usata, l'induzione dell'apoptosi dei linfociti T isolati dall'intestino di pazienti sani.

La tabella 1 mostra le percentuali di cellule linfocitarie T apoptotiche dopo 48 ore di coltura. I valori sono il risultato di quattro esperimenti separati nel corso dei quali sono state utilizzate le cellule T isolate dall'intestino di quattro soggetti normali.

Tabella 1

	Esp. 1	Esp. 2	Esp. 3	Esp. 4
Non stimolati	18%	17%	19%	23%
TGF- β 1 (0,2 ng/ml)	22%	24%	23%	25%
TGF- β 1 (1 ng/ml)	31%	33%	28%	31%
TGF- β 1 (5 ng/ml)	33%	34%	32%	37%

Invece, i linfociti T isolati da quattro pazienti affetti da MICI si sono dimostrati parzialmente resistenti al segnale apoptotico mediato dal TGF- β 1 come evidenziato dai risultati, riportati nella tabella 2 che mostra le percentuali di cellule linfocitarie T apoptotiche dopo 48 ore di coltura.

Tabella 2

	Esp. 1	Esp. 2	Esp. 3	Esp. 4
Non stimolati	11%	10%	9%	7%
TGF- β 1 (0,2 ng/ml)	12%	9%	8%	5%
TGF- β 1 (1 ng/ml)	10%	11%	11%	8%
TGF- β 1 (5 ng/ml)	16%	13%	14%	15%

In particolare dall'analisi dei valori riportati nella tabella 2 non si osserva alcun aumento significativo di apoptosi quando i linfociti T isolati da pazienti affetti da MICI vengono coltivati in presenza di TGF- β 1, sia in concentrazioni pari a 0,2 ng/ml sia pari a 1 ng/ml. Invece, la stimolazione di linfociti T isolati da pazienti affetti da MICI con TGF- β 1

in concentrazione pari a 5 ng/ml si traduce in un modesto aumento dell'apoptosi.

Il trattamento dei linfociti T isolati da pazienti affetti da MICI con ODN antisenso per Smad7 (SEQ. N°2) ripristina la responsività cellulare al TGF- β 1, con un aumento dell'apoptosi cellulare, come mostrato dai valori delle percentuali di cellule linfocitarie T riportati in tabella 3. I dati sono riferiti a quattro esperimenti separati nel corso dei quali i linfociti T isolati dall'intestino di quattro pazienti affetti da MICI, sono stati coltivati solo con mezzo di coltura (non stimolati) o trattati precedentemente con mezzo di coltura e con oligonucleotidi senso (controllo) o antisenso per tutta la notte e successivamente stimolati con TGF- β 1 (1 ng/ml).

Tabella 3

	Esp. 1	Esp. 2	Esp. 3	Esp. 4
Non stimolati	10%	9%	8%	7%
Mezzo di coltura	11%	9%	8%	5%
ODN Senso	12%	10%	10%	8%
ODN Antisenso	33%	32%	23%	19%

Inoltre usando colture d'organo *ex vivo*, l'autore della presente invenzione ha dimostrato che il trattamento delle biopsie MICI con ODN antisenso secondo la presente invenzione riduce in modo significativo il numero di linfociti T CD3+ a livello della mucosa, come indicato nell'immunoistochimica della figura 1. Quest'ultima mostra come il trattamento con l'ODN antisenso causa la riduzione del numero delle

cellule T CD3+ della mucosa.

Queste osservazioni considerate nel loro insieme suggeriscono che la presenza di alti livelli di Smad7 possa ricoprire un ruolo centrale nel prolungare la sopravvivenza delle cellule T, contribuendo perciò al propagarsi dell'infiammazione locale nelle MICI.

Quindi, il blocco di Smad7 potrebbe rappresentare una strategia promettente nel controllo dell'infiammazione a livello della mucosa in queste condizioni.

ESEMPIO 2: *Studio in vivo ed in vitro sugli effetti della somministrazione di oligonucleotidi antisenso e senso per Smad7 in modelli sperimentali di colite indotta da TNBS.*

MATERIALI E METODI

Tutti gli ODN senso ed antisenso per Smad7 sono stati sintetizzati da MWG Biotech S.r.l. (Firenze) avvalendosi delle metodiche standard precedentemente descritte.

Gli ODN antisenso utilizzati, aventi come bersaglio l'm-RNA codificante per Smad7, mappano in siti che mostrano omologia del 100% tra uomo e topo. In tutti i seguenti composti il legame internucleosidico è un legame fosforotioato. Tutte le sequenze di seguito descritte sono state impiegate negli esperimenti condotti in modelli di colite indotti sperimentalmente.

La sequenza dell'ODN antisenso per Smad7 SEQ. N°1 (5'-GTCGCCCCTTCTCCCCGCAGC-3') ha come target il sito 403 dell'm-RNA umano codificante per Smad7 ed è stata impiegata nel corso degli esperimenti già pubblicati in un articolo dall'autore della presente



invenzione (Monteleone et al., 2001).

Per l'ulteriore studio sul ruolo di Smad7 sulla regolazione dell'apoptosi nelle cellule T in LPMC isolate da pazienti affetti da MICI sono stati utilizzati gli oligoantisense SEQ. N°2 e SEQ. N°3 di seguito descritte.

La sequenza SEQ. N°2 dell'ODN antisense per Smad7 (5':MePG TMe-dCGCCCCTTCTCCCM-dCGCAMEPG-3') ha come target il sito 403 dell'm-RNA umano codificante per Smad7. Si tratta di un oligonucleotide misto al quale sono state apportate modifiche a carico delle citosine appartenenti alle coppie CpG della SEQ. N°1 che ivi figurano come 5-metilcitosine (indicate con Me-dC). Inoltre la molecola reca alle estremità dei ponti metilfosfonati (indicati con MeP).

La sequenza SEQ. N°3 dell'ODN antisense per Smad7 (5': GTT TGG TCC TGA ACA TGC-3') mappa nel sito 294 dell'm-RNA umano codificante per Smad7. I legami internucleosidici ivi presenti sono fosforotioati.

La sequenza SEQ. N°4 dell'ODN antisense per Smad7 (5': GTT TGG TCC TGA ACAT-3') mappa nel sito 296 dell'm-RNA umano per Smad7.

La sequenza SEQ. N°5 dell'ODN antisense per Smad7 (5': GTT TGG TCC TGA ACATG -3') mappa nel sito 295 dell'm-RNA umano per Smad7.

La sequenza SEQ. N° 6 dell'ODN antisense per Smad7 (5' AGC AC C G AG TG C G TG AGC-3') mappa nel sito 577 dell'RNA umano per Smad7.

La sequenza SEQ.N°7 dell'ODN antisenso per Smad7 (5' MePAGCACMedC GAGTGMedC GTGAGCMeP-3') mappa nel sito 577 dell'RNA umano per Smad7. Si tratta di un oligonucleotide misto avente nello scheletro delle sostituzioni apportate a livello delle citosine sottolineate nelle SEQ. N°6, ivi presenti come 5-metilcitosine. Inoltre legami metilfosfonati sono presenti alle estremità dell'oligonucleotide.

La sequenza SEQ. N°8 dell'ODN antisenso per Smad7 (5' CGA ACA TGA CCT CCG CAC-3) mappa nel sito 233 dell'RNA umano per Smad7.

La sequenza SEQ. N°9 dell'ODN antisenso per Smad7 (5'Me-d CGA ACA TGA CCT CMe-d CG CAC-3') mappa nel sito 233 dell'RNA umano per Smad7. Si tratta di un oligonucleotide misto avente nello scheletro delle sostituzioni apportate a livello delle citosine sottolineate nelle SEQ. N°8, ivi presenti come 5-metilcitosine.

La sequenza SEQ. N°10 dell'ODN antisenso per Smad7 (5'-GTMe-dCGCCCCTTCTCCCMedCGCAG-3') ha come target il sito 403 dell'm-RNA umano codificante per Smad7. Si tratta di un oligonucleotide misto in cui sono state apportate modifiche a carico delle citosine appartenenti alle coppie CpG della SEQ. N°1 che ivi figurano come 5-metilcitosine (indicate con Me-dC).

La sequenza SEQ. N°11 dell'ODN antisenso per Smad7 (5'-GATCGTTTGGTCCTGAA-3') ha come target il sito 299 dell'm-RNA umano codificante per Smad7.

La sequenza SEQ. N°12 dell'ODN antisenso per Smad7 (5'-

ATCGTTTGGTCCTGAAC-3') ha come target il sito 298 dell'm-RNA umano codificante per Smad7.

Induzione della colite

Topi di sesso maschile SJL/J di età compresa tra 5 e 6 settimane sono stati mantenuti in specifici ambienti sterili, privi di patogeni. Per l'induzione della colite sono stati somministrati, 2,5 mg di TNBS (pH 1,5-2,0; Sigma-Aldrich) in 50% di etanolo per via rettale per mezzo di catetere 3,5 F ai topi anestetizzati. La punta del catetere è stata inserita a circa 4 cm dall'apertura anale e successivamente sono stati somministrati 100 ml di fluido (TNBS/etanolo) lentamente a livello del colon.

Per assicurare la distribuzione del TNBS all'interno di tutto il colon e del cieco, i topi sono stati mantenuti in posizione verticale per 30 secondi dopo l'iniezione. Alcuni topi sono stati trattati solo con etanolo al 50% utilizzando la stessa procedura ed impiegati come controlli.

Valutazione istologica della colite

I tessuti rimossi dai topi a tempi stabiliti dopo la morte sono stati fissati in una soluzione di formalina al 10% (Sigma-Aldrich), immersi nella paraffina, tagliati in sezioni e colorati con ematossilina ed eosina. Le sezioni così colorate sono state esaminate per evidenziare la presenza di colite sulla base di criteri quali la presenza di infiltrazione di linfociti T, allungamento o deformazione delle cripte, ulcerazioni aperte ed ispessimento delle pareti.

Il grado di infiammazione all'analisi microscopica delle sezioni

del colon è stato valutato stabilendo una scala di valori compresi tra 0 e 4 come segue:

- 0: nessuna evidenza di infiammazione;
- 1: basso livello di infiltrazione linfocitaria con infiltrazione visibile in campo ottico ad alto ingrandimento $<10\%$ (hpf= high power field), nessun cambiamento strutturale osservato;
- 2: moderata infiltrazione linfocitaria con infiltrazione visibile in $<10-25\%$ hpf, allungamento delle cripte, ispessimento della parete intestinale che comunque non si estende oltre lo strato della mucosa;
- 3: alto livello di infiltrazione linfocitaria con infiltrazione visibile in $<25-50\%$ hpf, ispessimento della parete che si estende oltre lo strato della mucosa;
- 4: elevato livello marcato di infiltrazione linfocitaria con infiltrazione visibile in $>50\%$ hpf, alta densità vascolare, allungamento delle cripte accompagnato da deformazioni, ispessimento della parete intestinale con ulcerazioni.

Isolamento delle cellule mononucleari dalla lamina propria intestinale (LPMC) e trattamento delle cellule con ODN antisense per Smad7.

Le cellule mononucleate della lamina propria intestinale (LPMC) sono state isolate da campioni di colon. I campioni sono stati prima lavati in HBSS (Hanks' balanced salt solution, Sigma-Aldrich) priva di Ca^{2+} e Mg^{2+} e tagliati in pezzi di 0,5 cm. Quindi i campioni sono stati incubati per due volte successive per 15 minuti in HBSS contenente



EDTA (0,37 mg/ml) e ditiotreitolo (0,145mg/ml) a 37°C. I tessuti sono stati successivamente digeriti in RPMI contenente collagenasi D (400 U/ml, Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN) e Dnasi I (0,01 mg/ml, Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN) ed incubate sotto agitazione a 37°C.

Le LPMC rilasciate dai tessuti sono state risospese in Percoll al 100%, stratificate in presenza di un gradiente di Percoll al 40% (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) e centrifugate ad una velocità di 1800 rpm per 30 minuti per ottenere una popolazione arricchita di linfociti.

Per valutare l'efficacia *in vitro* dell'ODN antisenso per Smad7, le LPMC, isolate da topi trattati con TNBS, sono stati risospesi in RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) con aggiunta di HL-1 come agente sostitutivo del siero (Biowhittaker) alla concentrazione finale di 1×10^6 /ml in piastre da 24 pozzetti. Per la transfezione dell'ODN antisenso, sono stati impiegati 2 μ l di lipofectamina 2000 (LF, Invitrogen Italia SRL, San Giuliano Milanese) per ogni ml di coltura cellulare secondo il protocollo. Successivamente 2 μ g/ml di ODN antisenso ed LF sono stati miscelati ed incubati per 20 minuti a temperatura ambiente. La miscela così ottenuta è stata aggiunta direttamente alle cellule. Dopo incubazione per tutta la notte le cellule sono state rimosse dalla piastra e usate per l'analisi di Smad7 con Western Blotting.

Trattamento dei topi con ODN antisenso per Smad7

Due giorni dopo il trattamento con TNBS, sono stati somministrati ai topi per via rettale 150 μ g di ciascun oligonucleotide

senso o antisenso per Smad7. Sono stati esaminati almeno 5 animali per gruppo. Al quinto giorno i topi sono stati sacrificati e i campioni della mucosa intestinale sono stati prelevati e analizzati per il contenuto di Smad7 e Smad3 con Western Blotting. Inoltre è stata valutata l'entità del grado di infiammazione della mucosa intestinale.

Estrazione proteine ed analisi Western Blotting

Sia le cellule mononucleate della lamina propria intestinale che i campioni di colon sono stati omogeneizzati, secondo la procedura descritta precedentemente. E' stata successivamente rivelata l'espressione della proteina Smad7 mediante Western blotting.

Al termine, le membrane sono state strippate mediante una soluzione commerciale (Pierce) e successivamente incubate con un anticorpo anti-actina (Sigma-Aldrich) per accertare che le stesse quantità di proteine erano state caricate in ciascun pozzetto. La rivelazione è stata condotta mediante l'impiego di un kit a chemiluminescenza (Pierce). L'intensità delle bande è stata misurata con un densitometro.

Proteine estratte sia dalle LPMC che dai campioni di mucosa colica sono state anche analizzate mediante Western Blotting per il contenuto della proteina Smad3, sia totale che nella forma fosforilata, mediante l'utilizzo di specifici anticorpi commercialmente disponibili (Santa Cruz).

Per l'analisi di Smad3 in forma fosforilata sono stati impiegati un anticorpo di coniglio in grado di riconoscere come antigene le proteine Smad2/3 fosforilate (diluizione finale 1:500), ed un anticorpo di capra

anti-coniglio coniugato con la perossidasi (diluizione finale 1:20.000). L'immunoreattività è stata visualizzata mediante l'impiego di un kit a chemiluminescenza (Pierce).

Dopo la rivelazione, le membrane sono state strippate utilizzando una soluzione commercialmente disponibile (Pierce) ed incubate con uno specifico anticorpo di capra anti-umano per Smad3 (diluizione finale 1:500) e successivamente con un anticorpo di coniglio anti-capra coniugato con perossidasi (diluizione finale 1:20.000); quindi è stata visualizzata l'immunoreattività impiegando il kit a chemiluminescenza sopra menzionato.

Test ELISA

La quantità di TGF- β 1 attivo è stata esaminata in campioni mucosali intestinali. A tal fine sono state estratte proteine totali da campioni mucosali di topi con o senza colite da TNBS come indicato sopra. I livelli di TGF- β 1 attivo analizzati mediante un kit ELISA disponibile commercialmente (R&D Systems, Space Import-Export Srl, Milano). La densità ottica è stata misurata con un lettore ELISA Dynatech MR 5000 alla lunghezza d'onda di 490 nm. I risultati sono stati espressi come pg/100 μ g di proteine totali.

RISULTATI

I topi dopo avere ricevuto TNBS sviluppano diarrea e perdita di peso a supporto dell'induzione della colite. Il colon risulta macroscopicamente ingrandito e l'analisi istologica della mucosa rivela la presenza di moderate o severe lesioni infiammatorie.

Per verificare se l'induzione della colite sperimentale da TNBS

fosse associata a variazioni nella produzione del TGF- β 1, sono stati prelevati campioni di colon da topi, con e senza colite in atto, ed analizzati per il loro contenuto in TGF- β 1 attivo mediante ELISA.

Poiché a livello intestinale esistono diversi tipi cellulari che sono potenzialmente in grado di sintetizzare TGF- β 1, per la suddetta valutazione è stata utilizzata l'intera mucosa intestinale invece delle sole LPMC.

In assenza di colite sono stati rilevati bassi livelli di TGF- β 1 attivo (85 ± 12 pg/ μ g e 94 ± 26 pg/ μ g del totale delle proteine in topi rispettivamente non stimolati e di controllo). I livelli di TGF- β 1 erano significativamente aumentati in campioni mucosali prelevati da topi con colite indotta sperimentalmente dal TNBS (985 ± 120 pg/ μ g del totale delle proteine) ($p < 0.01$). Sebbene questo risultato sembrerebbe suggerire che in corso di colite da TNBS vi possa essere un incremento dell'attività del TGF- β 1, sorprendentemente l'analisi dei livelli intracellulari di Smad3 attivo in LPMC isolate dall'intestino dei topi con tale colite mostrava una diminuita fosforilazione di Smad3 e questo era associato con un'aumentata induzione di Smad7 (figure 2 e 3). In particolare, la figura 2 mostra la presenza di una banda corrispondente alla forma attiva (fosforilata) di Smad2/3 in LPMC isolate dall'intestino sano ma non in topi con colite da TNBS. Nella figura 3 si evidenzia come le due bande, di cui quella inferiore indicante una proteina di 47 Kda e corrispondente alla forma libera di Smad7 e quella superiore di 102 Kda e corrispondente al complesso formato da TGF- β 1 R1 e Smad7, sono presenti solo in campioni di

ING. PATRIZIO G. ZUCCHETTI ROMA SpA



LPMC estratte dall'intestino di topi con colite da TNBS. Questi risultati indicano che l'infiammazione locale stimola la sintesi del TGF- β 1 che non è comunque in grado di attenuare lo stato infiammatorio della mucosa.

Secondo la presente invenzione si è valutato se, in topi con colite indotta da TNBS, il trattamento con ODN antisenso per Smad7 possa ripristinare il funzionamento del TGF- β 1 endogeno e limitare il progredire dell'infiammazione.

E' stata pertanto inizialmente testata l'efficacia degli ODN antisenso per Smad7 sopra menzionati (SEQ.N°1-SEQ.N°10) nel causare una diminuzione nell'espressione di Smad7, sia *in vitro* che *in vivo*.

Per gli esperimenti *in vitro*, le LPMC isolate dall'intestino di topi con colite indotta da TNBS sono state trasfettate con ognuno degli ODN antisenso per Smad7 ed incubate per tutta la notte. L'analisi di Smad7 è stata condotta mediante Western blotting.

Per gli esperimenti *in vivo* sono stati somministrati gli ODN antisenso per Smad7 ai topi trattati con TNBS e dopo 3 giorni gli animali sono stati sacrificati, sono stati prelevati i campioni di tessuto ed è stata effettuata l'analisi di Western blotting di Smad7.

La tabella 4 riassume i risultati di questi esperimenti e mostra le percentuali di inibizione mediata da ciascun oligonucleotide antisenso per Smad7 negli esperimenti *in vitro* ed *in vivo*. I dati sono espressi come media \pm deviazione standard (DS) di quattro esperimenti separati *in vitro* e come media \pm DS di cinque esperimenti separati *in*

vivo.

Tabella 4

Sequenza	Sito	%inibizione in LPMC	%inibizione <i>in vivo</i>	Seq N°
gtcgccccttctccccgcagc	403	29 ± 3	33 ± 0.5	1
MePgtMedcgccccttctcc cMe-dcgcaMePg	403	34 ± 1.5	55 ± 3	2
gtt tgg tcc tga aca tgc	294	26 ± 2.6	25 ± 3.4	3
gtt tgg tcc tga acat	296	16 ± 2	15 ± 3.2	4
gtt tgg tcc tga acatg	295	17 ± 3.1	10 ± 1.12	5
agc acc gag tgc gtg agc	577 (*)	27 ± 0.88	25 ± 2.7	6
MePagcacMedc gag tgMedc gtg agcMeP	577 (*)	29 ± 1.65	30 ± 1.3	7
cga aca tga cct ccg cac	233 (**)	33 ± 2.3	32 ± 1.89	8
Me-d cga aca tga cct cMe-d cg cac	233 (**)	36 ± 1.5	34 ± 2.2	9
gtMedcgccccttctcccMe dcgcag	403	32 ± 4.1	42 ± 1.8	10
gatcgtttggtcctgaa	299			11
atcgtttggtcctgaac	298			12

(*) Sequenze N°.16 e (**) N°.12 del brevetto ISIS US6159697.

Tutti gli ODN antisenso si sono dimostrati efficaci nel provocare una diminuzione nell'espressione di Smad7 quando transfettati *in vitro* in LPMC isolate da modelli murini trattati con TNBS. Dall'analisi dei valori di percentuali di inibizione riportati in Tabella 4 si nota che le sequenze oligonucleotidiche antisenso 2, 8, 9 e 10 hanno mostrato un'efficacia maggiore.

Tuttavia, le percentuali di inibizione nell'espressione di Smad7 ottenute *in vivo* per il trattamento con le sequenze oligonucleotidiche 8 e 9 non differiscono sostanzialmente da quelle documentate negli esperimenti *in vitro*.

Invece, il trattamento dei topi con gli ODN antisenso 2 e 10 comporta una percentuale di inibizione di Smad7 nettamente superiore rispetto a quella registrata nel corso degli esperimenti condotti *in vitro* ossia 55% vs 34% e 42% vs 32% rispettivamente ($P < 0.01$).

Contrariamente, il trattamento dei topi con l'oligonucleotide antisenso 5 causa una diminuzione *in vivo* nell'espressione di Smad7 che è inferiore come entità rispetto ai risultati conseguiti transfettando *in vitro* l'oligonucleotide antisenso in LPMC, ossia 10% vs 17%, $P < 0.01$.

Complessivamente, tali risultati dimostrano che solo specifiche modifiche di una sequenza di ODN antisenso Smad7 sono in grado di migliorare il suo profilo farmacocinetico, biochimico, biofisico.

Nessun segno di tossicità acuta è stato documentato negli animali che hanno ricevuto gli oligonucleotidi antisenso (SEQ N°1-10).

Un topo su 5, tra quelli trattati con TNBS, è morto dopo 3 giorni (20%). In modo analogo, 1/5 degli animali che hanno ricevuto l'oligonucleotide senso per Smad7 è morto dopo 4 giorni.

Non si è registrata alcuna mortalità nel gruppo di topi trattati con le sequenze ODN antisenso per Smad7 da 1 a 10.

L'impiego delle sequenze ODN antisenso 11 e 12 si è associata a una discreta attività di inibizione *in vitro* (11% e 9.5% rispettivamente). Tuttavia, la somministrazione di tali sequenze *in vivo* si è inaspettatamente associata ad un marcato deterioramento della colite, fino a causare la morte di tutti i topi dopo 72 ore dal trattamento.

L'analisi macroscopica dei campioni intestinali prelevati da questi topi ha rivelato la presenza di una colite severa e questo era associato ad un aumento sostanziale dell'espressione di Smad7 a livello intestinale.

Come sopra descritto, è stata testata l'efficacia degli ODN antisenso per Smad7 nel limitare il propagarsi dell'infiammazione. A questo scopo, ai topi sono stati somministrati dopo induzione della colite gli oligonucleotidi antisenso 1, 2 e 3, considerando 5 animali per ciascun gruppo. A seguito del trattamento con ODN antisenso per Smad7 è stata rilevata una riduzione dello stato di infiammazione della mucosa. Questo è particolarmente evidente negli animali trattati con l'oligonucleotide antisenso SEQ N°2. Infatti, la severità della colite pari al grado 3-4 in topi con colite e non ricevuti antisenso, si riduce al grado 2 o 3 dopo somministrazione delle sequenze oligonucleotidiche antisenso 1 o 3 rispettivamente, mentre in topi trattati con la sequenza

ING. BAZZANO & ZUCCHATO ROMA SpA



oligonucleotidica SEQ N°2, l'infiammazione non supera mai il grado 1.

Queste osservazioni considerate nel loro insieme suggeriscono che l'uso degli ODN antisenso, che hanno mostrato la più elevata efficacia di inibizione di Smad7 accompagnata dall'assenza di effetti collaterali, in seguito alla somministrazione *in vivo*, possa rappresentare una strategia terapeutica promettente nel controllo dell'infiammazione a livello della mucosa in corso di MICI, soprattutto se tali caratteristiche di efficacia e tossicità vengono paragonate ai risultati conseguiti impiegando altre sequenze ODN antisenso con efficacia di inibizione di Smad7 *in vitro* di uguale entità.

BIBLIOGRAFIA

- Podolsky D.K., N.Engl.J. Med., 2002 Ago; Vol.347: No 6.
- Seegers D. et al. Aliment. Pharmacol. Ther., 2002; Vol.16: 53-58.
- Sandborn J., et al. Gastroenterology, 2002 Mag; Vol.122: No 6.
- Fiocchi C., J. Clin. Invest., 2001 Ago; Vol.108: 523-526.
- Powrie F., et al. J Exp Med 1996; 183: 2669-2674.
- Neurath M. F., et al. J Exp Med 1996; 183: 2605-2616.
- Ludviksson B. R., et al. J Immunol 1997; 159: 3622-3628.
- Shull M. M., et al. Nature 1992; 359: 693-699.
- Christ M., et al. J Immunol 1994; 153: 1936-1946.
- Hahm K.B., et al. Gut. 2001; 49:190-198.
- Gorelik L., et al. Immunity 2000; 12: 171-181.
- Heldin C-H., et al. Nature 1997; 390: 465-471.
- Yang X., et al. Embo J 1999; 18: 1280-1291.
- Hayashi H., et al. Cell 1997; 89: 1165-1173.
- Lawrance IC. et al. Inflamm Bowel Dis 2001;7:16-26.
- Monteleone G., et al. J. Clin. Invest., 2001. Giu; Vol.108:601-609.
- Boirivant M., et al. *Gastroenterology* 1999; 116: 557-565.
- Han SH., et al. J Pharmacol Exp Ther. 1998; 287:1105-12.
- Arsura M., et al. Immunity 1996; 5: 31-40.
- Brevetto statunitense US 6,159,697.
- Maggi A., Biotecnologie Farmacologiche, 1998; Cap.8: 125-131
- Agrawal S., Molecular Medicine Today, 2002; Vol. 6: 72-81.

- Neurath M., Fuss I., Strober W., Int Rev Immunol., 2000; Vol.19: 51-62.
- Lesiak K. et al., Bioconjugate Chem., 1993; Vol. 4: 467.
- Xiao W. et al. Antisense Nucleic Acid Drug Dev., 1996; Vol. 6: 247-258.
- Sanghvi et al, Nuclei Acids Research, 1993; Vol. 21: 3197-3203.
- Maier MA. et al. Org Lett., 2002; Vol. 2: 1819-1822.
- Guerlavais T., et al. Anal Bioanal Chem., 2002; Vol. 374: 57-63.
- Ragas J.A., et al. Analyst., 2000; Vol.125: 575-581.

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Serena Gitto
(N° d'iscr. 962 B)
Serena Gitto

ING. CARZANO & ZAMARRO ROMA SPA



RIVENDICAZIONI

1. Oligonucleotidi antisenso fosforotioati per Smad 7 di lunghezza fino a 21 nucleotidi comprendenti una porzione di almeno 10 nucleotidi della seguente sequenza:

5'-GTXYCCCCTTCTCCCXYCAG-3'

in cui X è un nucleotide comprendente una base azotata scelta dal gruppo che consiste in citosina, 5-metilcitosina e 2'-O-metilcitosina ed in cui Y è un nucleotide comprendente una base azotata scelta dal gruppo che consiste in guanina, 5-metilguanina e 2'-O-metilguanina, a condizione che almeno uno dei nucleotidi X o Y comprenda una base azotata metilata;

o la sequenza ad essa complementare.

2. Oligonucleotidi antisenso secondo la rivendicazione 1, in cui almeno un nucleotide della sequenza è metilfosfonato.

3. Oligonucleotidi antisenso secondo la rivendicazione 2, in cui detto almeno un nucleotide metilfosfonato si trova ad una sola o ad entrambe le estremità 3' e 5' o lungo la sequenza dell'oligonucleotide antisenso.

4. Oligonucleotidi antisenso secondo la rivendicazione 2, in cui il nucleotide metilfosfonato è Y.

5. Oligonucleotidi antisenso secondo la rivendicazione 2, in cui il nucleotide metilfosfonato è X.

6. Oligonucleotidi antisenso secondo la rivendicazione 1, in cui almeno un nucleotide della sequenza è un 2'-O-metilribonucleoside 5'-monofosfato.

ING. BARTARO & ZANARDI ROMA SpA



7. Oligonucleotidi antisenso secondo la rivendicazione 6, in cui detto almeno 2'-O-metilribonucleotide 5'-monofosfato si trova ad una sola o ad entrambe le estremità 3' e 5' o lungo la sequenza dell'oligonucleotide antisenso.

8. Oligonucleotidi antisenso secondo ognuna delle rivendicazioni precedenti in cui i 2'-desossiribonucleotidi sono sostituiti con i ribonucleotidi corrispondenti.

9. Oligonucleotidi antisenso secondo ognuna delle rivendicazioni da 1 a 8 aventi la sequenza:

5'-ZTXGCCCCCTTCTCCCXGCAZ-3'

in cui X è 5-metil 2'-desossicitidina 5'-monofosfato e Z è 2'-desossiguanosina metilfosfonato.

10. Oligonucleotidi antisenso secondo la rivendicazione 1 aventi la sequenza:

5'-GTXGCCCCCTTCTCCCXGCAG-3'

in cui X è una 5-metil 2'-desossicitidina 5'-monofosfato.

11. Oligonucleotidi antisenso come definiti nelle rivendicazioni da 1 a 10 per uso in campo medico.

12. Composizione farmaceutica comprendente come principio attivo almeno un oligonucleotide antisenso come definito nelle rivendicazioni da 1 a 10 assieme ad uno o più coadiuvanti e/o eccipienti farmacologicamente accettabili.

13. Uso degli oligonucleotidi antisenso come definiti nelle rivendicazioni da 1 a 10 per la preparazione di un medicamento per il trattamento delle malattie associate con l'espressione di Smad7.

14. Uso secondo la rivendicazione 13, in cui le malattie associate con l'espressione di Smad7 sono le malattie infiammatorie croniche.

15. Uso secondo la rivendicazione 14, in cui le malattie infiammatorie croniche sono la malattia di Crohn e la colite ulcerativa.

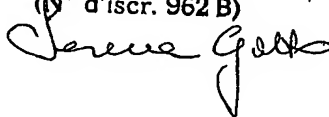
Roma, - 2 APR. 2003

p.p. : GIULIANI S.p.A.

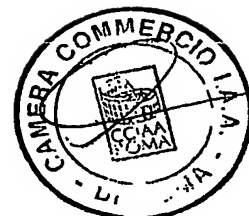
ING. BARZANÒ & ZANARDO ROMA S.p.A.

SG/IC

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Serena Gitto
(n° d'iscr. 962 B)



ING. BARZANÒ & ZANARDO ROMA S.p.A.

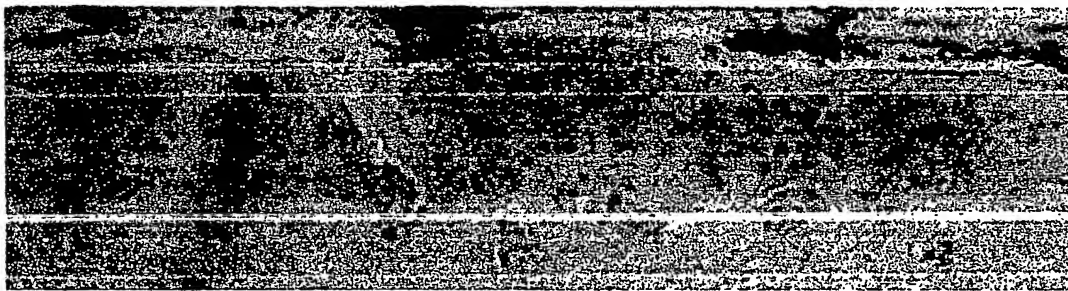


1/2

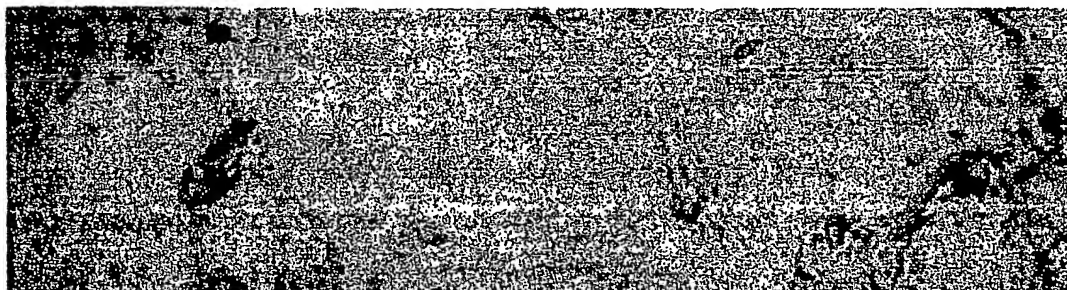
RM 2003 A 000149



N.S.



ODN Senso



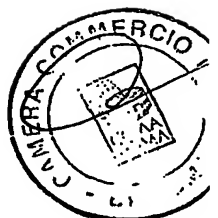
ODN Antisenso

Fig. 1

p.p.: GIULIANI S.p.A.
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Serena Gitto
(N° d'iscr. 962 B)

Serena Gitto



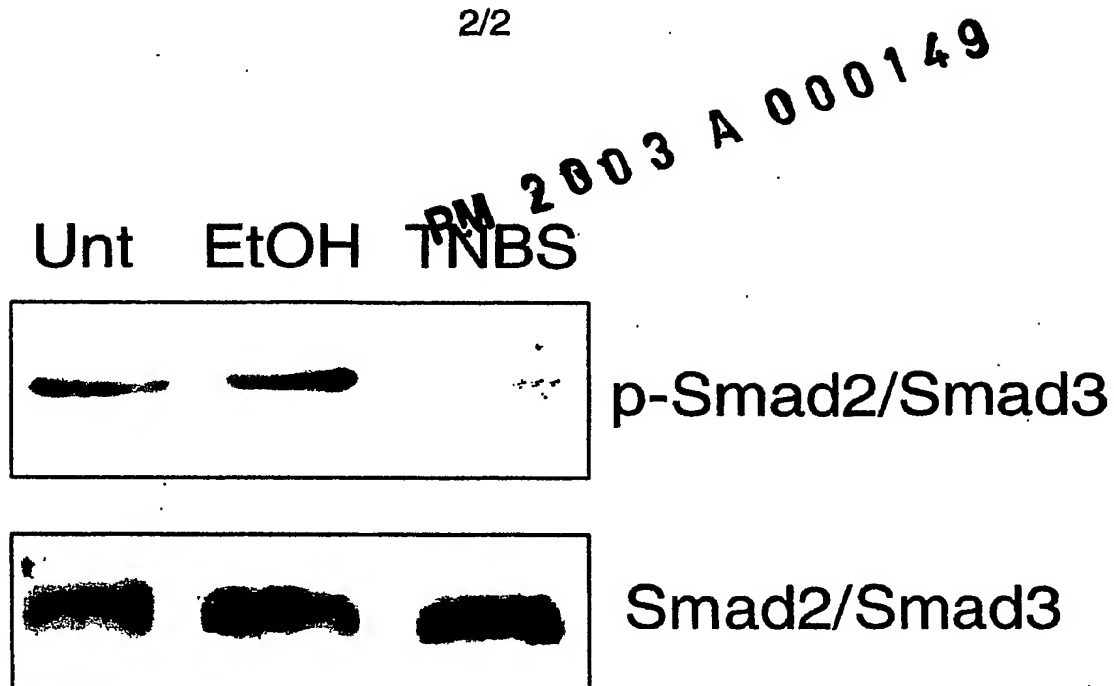


Fig. 2



UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Serena Gatto
(N° d'iscr. 9626)

Serena Gatto

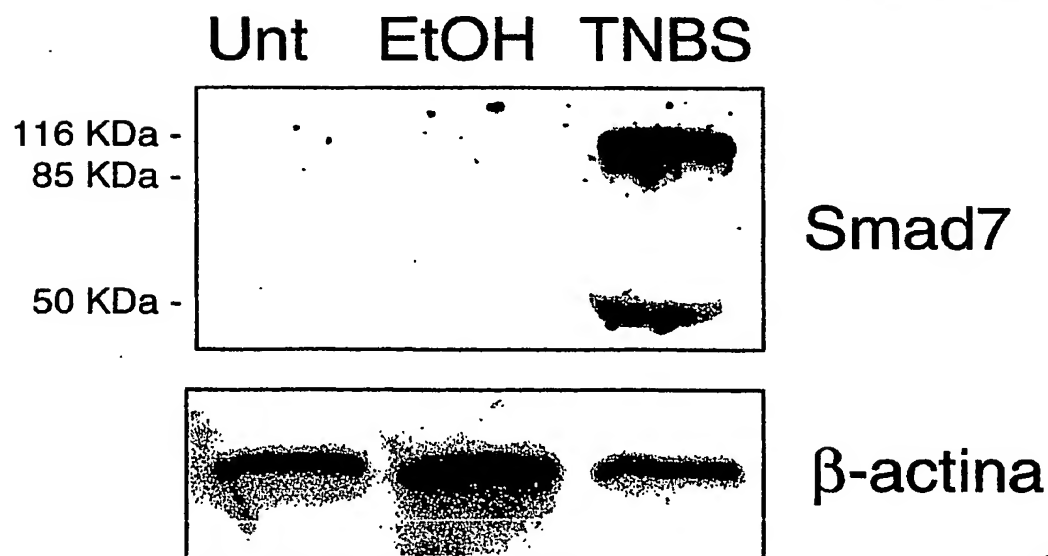
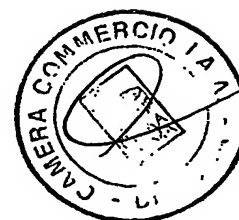


Fig. 3



p.p.: GIULIANI S.p.A.
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.